

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. ⁶ C12N 15/52	(11) 공개번호 특 1999-0086028 (43) 공개일자 1999년12월15일
(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-1998-0018810 1998년05월25일
(71) 출원인	주식회사 우진 강석진 경기도 화성군 양감면 송산리 528-5 배회동
(72) 발명자	경기도 수원시 팔달구 우만동 주공2단지아파트 201동 404호 포스버그 세실 더블유 디파트먼트 오브 마이크로바이올로지 유니버시티 오브 구엘프 구엘프, 온타리오 앤1지 2더블유1, 캐나다 골로벤 세르게이 디파트먼트 오브 마이크로바이올로지 유니버시티 오브 구엘프 구엘프, 온타리오 앤1지 2더블유1, 캐나다 청 규오 조안 애그리컬처 앤드 애그리-푸드 캐나다 리서치 스테이션 피.오. 박스 3 메인 리 스브리지, 알베르타 티1제이 4비1, 캐나다
(74) 대리인	이덕록

심사청구: 있음

(54) 신규한 파이타제 유전자, 재조합 파이타제 및 그 용도

요약

본 발명은 고효율의 우수한 파이타제 유전자 PhyE의 염기서열을 결정하고 이 유전자로 대장균 BL21(DE3)을 형질전환시킨 후 배양하여 재조합 파이타제를 대량 생산하는 방법을 제공한다.

본 발명의 재조합 파이타제는 넓은 pH 범위에서 안정하고 4 내지 60°C의 온도에서 역가가 우수하며 단백질 분해효소에 대한 저항성이 뛰어나 가축사료 첨가물로 이용할 경우 가축의 성장을 촉진하고 가축 분내의 인의 함량을 감소시켜 환경오염을 감소시키는 뛰어난 효과가 있다.

대표도

도2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 대장균 ATCC 33965로부터 appA 유전자를 클로닝한 결과를 나타낸다.

도 2는 파이타제 활성이 우수한 PhyE 유전자의 염기서열을 나타낸다.

도 3은 파이타제 활성이 우수한 PhyE 유전자의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 4는 파이타제 활성이 있는 대장균 물질을 스크리닝한 결과를 나타낸다.

도 5는 여러 단계의 정제를 거친 재조합 파이타제의 SDS-PAGE 분석 사진도이다.

도 6은 세포추출물내의 단백질을 pH2.5에서 산침전시켜 정제한 재조합 파이타제를 SDS-PAGE로 분석한

사진도이다.

도 7은 위액과 판크레틱 프로테아제(pancreatic protease)에 대한 파이타제 저항성을 나타낸 그래프이다.

도 8은 대장균 파이타제합성에 미치는 pH의 영향을 나타낸 그래프이다.

도 9는 대장균 파이타제의 최적 온도를 나타낸 그래프이다.

도 10은 재조합 파이타제 합성을 한스-울프 플롯(Hanes-Woolf plot)으로 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 신규한 파이타제 효소에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 활성이 우수한 파이타제 효소의 유전자를 결정하고 클로닝한 후 숙주세포에 도입하여 합성이 우수한 파이타제 효소를 생산하는 방법에 관한 것이다.

인은 식물에 있어서 필수 광물질로서 가축 사육시 세 번째로 많이 요구되는 성분이다. 일반적으로 두류나 곡류에 함유되어 있고 전체 인 가운데 60 ~ 70%는 피틴산(Phytic acid; inositol hexaphosphate)으로 풀리우는 유기물 형태로 존재하며 주로 1가 혹은 2가의 양이온 파이테이트(phytate)염 형태로 식물내 함량은 0.4 ~ 0.6%로 알려져 있다. 그러나 이러한 파이테이트는 단위가축이 소화흡수하지 못하고 분으로 배설하므로 인의 환경오염원에 직접적인 영향을 미치는 심각한 물질로 알려져 있다. 또한 성장을 위하여 인을 필요로 하는 단위가축은 파이테이트를 이용하지 못하기 때문에 가축의 생산성 유지 또는 개선을 위하여 무기태인(inorganic phosphate)의 사료내 첨가가 필수불가결 하였다. 이러한 무기태인의 사료내 첨가는 가금류나 돼지의 생산성을 향상시키지만 경제적으로 가축사육 농민들에게는 상당한 경제적 부담을 주게됨은 물론 분으로 배설되는 파이테이트는 환경오염 물질로 배출이 규제되고 있다.

따라서 이러한 문제를 해결하기 위하여 네덜란드, 독일, 한국 및 대만정부는 돼지나 가금류의 분에 포함된 인으로 인해 발생하는 환경오염을 입법으로 막고 있거나 서두르고 있다. 축산업계에서는 인의 공급을 감소시키고 오염을 줄이기 위한 방법을 다각도로 모색하고 있으며 그중 한 방법으로서 사료에 함유되어 있는 파이테이트내 인의 이용율을 높히므로써 인의 첨가량을 감소시킬 수 있는 파이타제(Phytase)의 첨가 방법을 가장 바람직한 것으로 검토하고 있고 이를 입법화하려는 경향이 있다.

최근 양계 및 양돈 사료에 파이타제를 첨가하여 파이테이트 이용율을 높히고 인으로 인한 오염을 예방하려는 연구가 진행되고 있다. 파이타제는 파이테이트를 무기태인과 인노시톨(inositol)로 가수분해하므로써 돼지에서 인 이용율을 24%까지 증가시키고 그만큼 사료내 인 첨가량을 감소시킨다고 알려져 있다. 즉, 인의 이용성을 증가시키므로써 분내 35%의 인 배설량을 감소시키고 분내에 함유된 인으로 인한 환경오염을 그만큼 감소시킬 수 있다. 또한 사료내 파이타제를 첨가하면 무기태인의 첨가량을 감소시킬 수 있으며 파이타제는 칼슘이나 아연과 같은 광물질의 생물학적 이용율을 증가시키고 파이테이트와 결합되어 있거나 킬레이트된 아미노산과 같은 영양소의 이용율을 증가시켜 이용성을 현저히 개선시키는 효과가 있어 결국 사료의 이용성을 현저히 개선시키는 것으로 알려져 있다. 최근에는 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 또는 아스퍼질러스 피쿠럼(*A. ficum*)등의 곰팡이로부터 사료용 파이타제가 생산되어 이용되고 있다. 아스퍼질러스 나이거의 파이타제는 최적 pH가 2.5 ~ 5.5에 이르며 돼지나 가금류의 위나 사낭에서 효소역가를 나타내지만 pH가 6이상인 소장내에서는 어려운 것으로 보고되고 있어 이를 보완할 방법이 요구되어 왔다. 그리고 아스퍼질러스 나이거 유래의 파이타제 비활성(Specific activity)은 약 100unit 정도인데 이러한 정도의 역가는 그렇게 높은 것이 아니기 때문에 비용절감을 위하여 이보다 훨씬 높은 파이타제 개발이 요구되고 있다.

파이타제는 옥수수, 캐놀라 등 광범위한 식물이나 프로토조아(protozoa), 마이코리자(mycorrhizae), 곰팡이, 이스트 및 박테리아 등에서 생산된다. 특히 보고된 모든 파이타제는 대개 8.7unit(*B. subtilis*)에서 63unit(*K. aerogens*)에 이르기까지 그렇게 높은 활성을 나타내지 않으나 대장균 스트레인 K12(*E. coli* strain K12)가 8000unit에 이르는 높은 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있으며, K_m 과 k_{cat} 는 0.13mM과 6209s⁻¹로 알려져 있다. 대장균의 경우 인산화되어 있는 물질을 분해하는 능력을 지닌 애시드 포스파타제(acid phosphatase)도 약 750(U/mg protein) 정도이고 K_m 과 k_{cat} 는 7.8mM과 490s⁻¹로 알려져 있다. 또한 대장균 파이타제의 분자량은 다른 미생물로부터 생산되는 파이타제보다 현저히 낮은 약 42,000이고 모노머로서 기능을 가지고 있으며 애시드 포스파타제는 최적 pH가 2.5였던 반면에 파이타제는 다른 미생물이 지니고 있는 바와 같이 최적 pH는 4.5이고 최하로 pH 2.0까지 활성을 나타내며 4°C에서 pH 1.0에 24시간 노출했을 경우에도 약 30%의 활성을 나타냈고 효소의 최적 온도는 55°C이고 60°C에서 급격히 감소하는 특징을 지닌 것으로 알려져 있다. 또한 대장균 파이타제는 50°C에서 1시간동안 안정적이고 60°C에서 약 24%만 유지되고 70°C에

서는 거의 활성을 나타내지 않는 것으로 보고되었다. 그러나, 대장균의 이러한 파이타제 유전자는 지금까지 클로닝된 바 없으며, 이를 연구한 Greiner 등(1993)은 Dassa 등(1982)에 의하여 파이타제는 최적 pH가 2.5 인 애시드 포스파타제와 유사한 것이라고 결론지었다.

본 발명자는 대장균 계통(E.coli) K10의 appA 유전자에 의하여 암호화된 애시드 포스파타제가 매우 높은 파이타제 활성을 나타내므로 향후 사료뿐만 아니라 다른 산업에서도 활용할 가능성이 매우 높은 것에 주목하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

따라서, 본 발명의 목적은 고효율의 파이타제 효소를 대장균에서 발현되는 포스파타제로부터 분리정제함에 있다. 본 발명의 다른 목적은 고효율의 파이타제를 암호화하는 유전자를 시퀀싱한 다음 이 유전자로 숙주세포를 형질전환시킨 후 배양하여 고효율의 파이타제를 대량 생산함에 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 상기 목적은 대장균(E.coli)이 가지고 있으며 appA 유전자에 의해 파이타제활성을 나타내는 효소 중 가장 우수한 파이타제활성을 나타내는 효소를 스크리닝하고 이 효소의 유전자 염기서열을 결정한 후 PhyE 유전자를 PCR로 증폭하고 pET 21a(+) 벡터에 삽입하여 숙주세포를 형질전환시켜 배양함으로써 재조합된 파이타제를 발현시키고 발현된 재조합 파이타제를 농축하고 정제한 후 SDS-PAGE 분석하고 단백질을 정량한 다음 파이타제와 애시드 포스파타제 활성을 측정하고 후 이어서 재조합 파이타제 분해를 단백질 분해효소가 함유된 단백질 혼합액에 첨가하고 효소활성을 측정하여 단백질 분해효소에 대한 저항성, 최적 온도, 최적 pH, 반응속도 등 효소특성을 조사함으로써 달성하였다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 대장균이 가지는 최소한 6가지의 페리플라스믹 포스파타제(periplasmic phosphatases; Wanner, 1996)를 제한효소로 처리하고 플라스미드에 삽입한 후 이 플라스미드로 대장균 DH5 α 를 형질전환시키고 배양하는 단계; 배양된 콜로니의 파이타제 활성 및 애시드 포스파타제 활성을 측정하여 파이타제 활성이 가장 우수한 효소를 얻은 후 이 효소의 유전자 염기서열을 결정하고 PhyE로 명명하는 단계; PhyE 유전자를 벡터에 삽입하고 이 벡터로 대장균 BL21(DE3)을 형질전환시킨 후 배양하여 PhyE 유전자에 의해 재조합된 파이타제를 발현시키는 단계; 발현된 재조합 파이타제를 추출하고 농축한 후 DEAE-세파로스 CL 6B 및 세파덱스 G-75 칼럼으로 크로마토그래피하여 정제하는 단계; 정제된 재조합 파이타제를 SDS-PAGE로 분석한 후 단백질을 정량하는 단계; 재조합 파이타제의 파이타제활성 및 애시드 포스파타제활성을 측정하는 단계; 단백질과 단백질 분해효소가 함유된 혼합액에 정제된 재조합 파이타제 효소를 첨가하고 효소활성을 측정하여 단백질분해효소에 대한 저항성을 측정하는 단계; 온도와 pH를 달리하면서 재조합 파이타제 효소의 활성 변화를 측정하여 최적 온도 및 최적 pH를 조사하는 단계 및; 효소의 반응속도를 조사하는 단계로 구성된다.

본 발명의 실험에 사용된 박테리아 균주는 대장균(E.coli)계통으로 DH5 α [(supE44 Δ lacU169(Φ 80 lacZ Δ M15_ hsdR17 recA1 endA1 gry A96thi -r Δ 1)](Hanahan 1983), CU1867(appA:Kan R)(Ostanin 등., 1992)와 BL21(DE3)(Novagen, Madison, WI) 및 BL21(DE3)(F'ompT hsdS Δ (r $^+$ m $^+$)dcm ga(DE3)(Novagen, Madison, WI) 등이다. 또 모든 분자생물학적 방법은 샘브록(Sambrooke;1989)의 방법에 의하여 수행하였다. DNA는 CTBA 처리없이 수행하는 것만 제외하고 머레이(Murray)와 톰슨(Thomson)(1980)의 방법에 의하여 수행하고 DNA의 PCR 증폭은 사이키(Saiki) 등(1988)의 방법에 의하여 수행하였다.

이하, 본 발명의 구체적인 구성 및 작용을 실시예를 들어 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정하는 것은 아니다.

실시예 1: 파이타제활성 효소 스크리닝 및 유전자 염기서열 결정

실시예 1: 대장균 ATCC 33965로부터 파이타제 활성효소 스크리닝

대장균은 여러종류의 포스파타제를 가지고 있으며 최소한 6가지의 페리플라스믹 포스파타제(Wanner, 1996)가 존재하고 있는 것으로 알려져 있다. 본 발명자는 돼지와 같은 단위동물의 위내 산성조건내에서 활성이 있는 파이테이트-분해 효소(phytate-degrading enzyme)를 대장균 ATCC 33965로부터 스크리닝하였다. 이 때 사이토플라스믹 효소(Cytoplasmic enzyme)보다는 페리플라스믹 효소(periplasmic enzyme)가 안정적이므로 페리플라스믹 효소를 사용하였다.

대장균 ATCC 33965로부터 채취한 게놈 DNA는 제한효소 BamHI와 BglII 엔도뉴클레아제(endonucleases)로 절단하여 4-6kb의 분해를 아가로스 겔(agarose gel)로 추출한 후 constitute 프로모터인 tet gene를 사용하여(Boguet 등, 1987) 모든 유전자가 발현되는 pBR 322 플라스미드의 BamHI 부위에 라이게이션시킨 후, 이 벡터로 대장균 DH5 α 스트레인을 형질전환시키고 염피실린이 함유된 LB 배지에서 배양하였

다.

실험예 2: 파이타제 및 애시드포스파타제 활성측정

appA 유전자에 의해 애시드 포스파타제 활성을 나타낼 경우도 1에서 나타내는 바와 같이 검은 침전을 형성하는 염색약(0.1M 소듐 아세테이트 pH 5, 0.1% α -나프틸 포스페이트, 0.2% fast Gamet GBC 염, 37°C)을 상기 실험예 1에서 배양한 콜로니에 처리하여 애시드 포스파타제를 스크리닝하여 선별한 후 높은 애시드 포스파타제 역가를 나타내는 콜로니를 다시 플레이트에서 배양하였다. 배양된 상기 콜로니를 파이테이트가 함유된 아가(1% 아가, 10mM 소듐 아세테이트 pH 4.5, 20mM 소듐 파이테이트, 50mM CaCl₂) 배지 상층에 오버레이(overlay)하고 6시간 배양한 후 파이타제 활성을 측정하여 파이타제 활성이 우수한 콜로니를 선별하였다. 실험결과, Greiner 등(1993)이 추출한 효소(애시드 포스파타제 활성: 790 unit/mg, 파이타제 활성: 8000 unit/mg)보다도 낮은 애시드 포스파타제 활성(1200 unit/mg)을 나타냈다. 브레드포드 방법으로 측정된 단백질 함량을 기준으로 계산하더라도 greiner 등(1993)의 결과와는 차이가 있었다(애시드 포스파타제 활성: 12,883 unit/mg, 파이타제 활성: 38,649 unit/mg). 또한 파이타제/애시드 포스파타제 비율 차이도 각각 독립적인 방법을 취하였을 때 Greiner 등이 10배였던 것에 비해서 3배의 차이를 나타냈다.

실험예 3: 파이타제 활성 효소 유전자 염기서열 결정

상기 실험예 2의 결과 선별한 우수한 파이타제 활성 콜로니를 제한맵핑(restriction mapping)에 따라 3개의 유전자 그룹으로 분류했다. 실험결과, 가장 파이타제 활성이 우수한 효소 유전자인 PhyE와 상기 PhyE 유전자와는 다른 특성을 지닌 효소 유전자 App 및 기능이 밝혀지지 않은 효소 유전자 PhyC 유전자로 분류하였다. PhyE 유전자의 염기서열은 도 2에 나타냈고 아미노산 서열은 도 3에 나타냈다.

실시예 2: PhyE 유전자의 PCR 및 형질전환

상기 실시예 1의 실험예 3에서 얻은 PhyE 유전자는 하기와 같은 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍을 사용하여 PCR로 증폭하였다.

APPA-ATG 5'GCATATGAAAGCGATCTTAACCCAT 3'(NdeI site)

APPA-TAA 5'GGGAATTCATTACAACTGCACGCCG 3'(EcoRI site)

PCR 산물을 적절한 엔도뉴클레아제(endonuclease)로 절단한 후, NdeI과 EcoRI 엔도글루카나제(endoglucanase)로 처리한 pET21a(+) 발현벡터(Novagen, Madison, WI)에 라이게이션시켰다. 이 발현벡터를 대장균 BL21(DE3)를 형질전환시키고 엠포실린이 함유된 LB 배지에서 배양하였다. 37°C에서 12시간 배양한 플레이트는 파이테이트가 함유된 배지에 오버레이(overlay)시켰다. 도 4와 같이 할로스(Halos) 생성 콜로니는 분석용으로 보존하였다.

본 실시예에서 형질전환된 대장균 BL21(DE3)은 한국종균협회에 1998년 5월 13일자로 기탁번호 KFCC 11033로 기탁하였다.

실시예 3: 재조합 파이타제 효소의 정제

실험예 1: 표준방법에 의한 파이타제 정제

재조합 파이타제는 Ostanin 등(1992)의 방법을 수정하여 추출, 정제하였다. 실시예 2에서 12시간 배양한 대장균 BL21(DE3)을 엠포실린(100 µg/mL)을 첨가한 4리터 LB 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 셰이킹(Shaking) 배양하였다. 세포를 수거한 후 차가운 사린(saline)(0.82%) 용액으로 세척하고 1mM EDTA 및 라이소자임(lysozyme)(1mg/mL)이 함유된 200mL 차가운 20%(W/V) 슈크로스 용액[33mM Tris/HCl(pH 8.0)]에 다시 재현탁시키고 20분간 방치한 후 15분간 8000rpm에서 원심분리하여 상등액을 채취하였으며 PM30 막(Amicon)을 통하여 한외여과(Ultrafiltration)시켜 농축하였다. 상기 모든 과정은 4°C에서 수행되었으며 농축시킨 상등액은 50mM Tris/HCl(pH 7.8) 완충용액으로 미리 균형을 맞춘 DEAE-세파로스 CL-6B 칼럼(2.6 x 30cm)에 옮겨 분리하고 800mL 완충용액으로 세척한 후 0 ~ 0.2 M 소듐 크로라이드(linear gradient)를 사용하여 약 30mL/h 속도로 용출시켰다. 이때 효소는 0.09 ~ 0.1 M NaCl 조건에서 용출시켰다. 가장 높은 활성을 나타낸 분획과 단백질 함량이 가장 낮은 분획은 다시 혼합한 후 PM30 막(Amicon)에 다시 통과시켜 농축하였다. 농축된 용액은 50mM Tris/HCl(pH 7.8) 완충용액으로 미리 균형을 맞춘 세파덱스 G-75 칼럼(2.6 x 90cm)에 로딩하였으며 0.9% NaCl과 동일한 완충용액을 사용하여 약 10mL/h 속도로 용출시켰다. 분획은 다시 채취하였으며 재조합 파이타제를 분석하였고 10% SDS-PAGE 겔로 분석하였다. 가장 높은 활성을 나타내고 단백질이 오염되지 않은 분획은 농축하고 PM30 막(Amicon)을 통하여 무석하였다. 정제된 재조합 파이타제는 도 5에 나타낸 바와 같이 10% SDS-PAGE로 분석하였다.

실험예 2: 산 침전에 의한 파이타제 정제

실시예 2에서 4리터 LB 배지에서 배양된 세포를 수거한 후 차가운 사린(saline)(0.82%) 용액으로 세척하고 1mM EDTA 및 라이소자임(lysozyme)(1mg/mL)이 함유된 200mL 차가운 20%(W/V)

슈크로스용액(30mM Tris/HCl)(pH 8.0)에 다시 재현탁시킨 후 세포는 약 20분간 얼음에 방치하였으며 0.1M 글리신/HCl buffer(pH 2.5) 100mL를 첨가하고 얼음에서 약 1시간 가량 방치하였다. 추출된 단백질과 핵산은 약 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 제거하였으며 채취한 효소 용액은 무석하고 농축시킨 후 DEAE-셀파로스 CL 6B와 셀파덱스 G-75에 칼럼 크로마토그래피하여 정제하였다. 정제후 SDS-PAGE로 분석한 결과를 도 6에 나타냈다.

실시예 4: 재조합 파이타제 효소의 단백질 정량

상기 실시예 3에서 정제한 재조합 파이타제의 단백질 함량을 측정하였다. 단백질 함량은 브래드포드 방법(Bradford, 1976), 비시콜닉 애시드(bicichonic acid; BCA)를 사용하는 방법(Smith 등, 1985), UV 흡광도를 측정하는 방법(Ostanin 등, 1992) 및 동결건조 후 건물중량을 측정하는 방법으로 측정하였다. 실험결과, 브래드포드 단백질 측정 방법으로 파이타제의 측정 함성이 지나치게 높아 단백질 함량은 소량으로 평가되었다. 단백질 함량 평가방법을 상호비교했을 때, 브래드포드 분석법이 동결건조 방법으로 측정한 수치보다는 낮은 수치를 나타냈으며 OD_{280nm} 측정법이나 비시콜닉 애시드 방법은 동결건조 방법으로 측정한 수치와 유사한 것으로 나타났다. 이러한 결과를 표 1에 정리하였다.

[표 1]

정제된 파이타제의 농도 측정

단백질 측정방법	단백질 함량 (mg/mL)	파이타제의 측정함성 (U/mg)	파이타제의 측정함성 (%)
브래드포드(Bio-Red)	0.77	38649	2312
BCA	24.8	1200	72
OD ₂₈₀	14.7	2024	121
건조물량	17.8	1672	100

실시예 5: 재조합 파이타제 효소활성 및 애시드 포스파타제 활성 측정

파이타제 및 애시드 포스파타제 활성 측정은 약 37°C에서 측정하였다. 애시드 포스파타제 분석은 p-니트로페닐 포스페이트(25mM)를 기질로 사용하였으며 0.25M 글리신/HCl buffer(pH 2.5) 200μL에서 10분간 반응시킨 후 1.0M 소듐 하이드로사이드 1mL 첨가하여 반응을 종료시켰으며 유리된 p-니트로페닐 포스페이트 함량은 410nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 애시드 포스파타제 역가는 분당 유리된 p-니트로페닐 1μmole을 1unit로 하였다. 파이타제 분석은 소듐 파이테이트(4mM)를 기질로 하여 0.1M 아세테이트(acetate)/아세트릭 애시드 버퍼(acetic acid buffer)(pH 4.5) 200μL에서 10분간 반응시킨 후 133μL의 암모늄 몰리브데이트(ammonium molybdate):암모늄 반나데이트(ammonium vanadate):니트릭 애시드 (nitric acid) 혼합물을 첨가하여 반응을 정지시켰으며 유리된 무기 포스페이트(inorganic phosphate) 함량은 410nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 파이타제 활성은 분당 유리된 무기 포스페이트 1μmole을 1unit로 하였으며 모든 분석은 3번 반복하였다. 실험결과, 파이타제와 애시드 포스파타제의 활성은 단백질 mg당 각각 1,800 unit와 479 unit였으며 파이타제와 애시드 포스파타제 활성 비율은 3.8이었다. 이는 실시예 1의 실험에 2에서 ATCC 33965로부터 얻은 결과와 유사하였다. 그러나 대장균 ATCC 33965로 얻은 PhyE 유전자의 염기서열은 appA 유전자 염기서열과 다른 QEPELKLESVV로 확인되었다.

실시예 6: 단백질 분해효소에 대한 저항성 측정

1mg/mL의 펩신(20mM 글리신/HCl, pH 2.5)이나 각각 1mg/mL 키모트립신(chymotrypsin), 트립신(trypsin), 엘라스타제(elastase) 및 판크레틴(pancreatin)(20mM MOPS, pH 7.0)이 혼합되어 있는 판크레틱 프로테아제(pancreatic proteases)의 혼합액에 정제된 재조합 파이타제를 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 활성을 측정하여 평가하였다. 또 쥐의 장내 소화액과 위액에 대하여도 같은 방법으로 실험을 실시하였다. 실험결과, pH 2.5인 펩신은 80%의 활성을 나타내 단백질 분해효소에 대해 안정성이 높았다. pH 7인 판크레틴에서는 38%의 활성을 나타내 비교적 좋은 안정성을 나타냈으며(도 7) 쥐의 위액에서는 100% 활성을 나타냈고 장내 소화액에서는 37°C에서 40%의 역가를 유지함으로써 우수한 안정성이 있음을 확인하였다.

실시예 7: 최적 온도 및 최적 pH 조사

재조합 파이타제의 최적온도를 측정하기 위하여 30°C에서부터 90°C에 걸쳐 표준 파이타제 분석방법을 실시하였다. 최적 pH는 글리신/HCl(pH 1-3.5), 소듐 아세테이트, 아세트산(pH 3.5-6), 트리스/아세트산(pH 6-7), 트리스/HCl(pH 7-9), 글리신/NaOH(pH 9-10)을 사용하여 측정하였으며 모든 완충용액의 농도는 0.1M로

하였다. 실험결과 대장균 파이타제는 0.1M 소듐 아세테이트/아세트산 버퍼 pH 4.5에서 한 개의 적정(Optum) pH를 나타냈다. 또한 pH 7~7.5 조건에서는 활성이 급격히 감소하는 경향을 나타냈고 pH 7.0에서는 거의 75%의 활성을 나타냈으며 pH 2에서는 40%의 활성을 유지하는 것으로 나타났다(도 8).

파이타제의 최적온도는 메조필릭 유기물(mesophilic organism)이 나타내는 일반적인 현상과는 달리 60°C에서 높은 안정성을 나타냈다(도 9). 또한 일반적인 파이타제 분석법을 사용하였을 때 60°C에서의 특징 합성은 37°C에서의 4.2배 높았으며 37°C에서의 파이타제 합성은 75°C에서의 합성과 같은 것으로 나타났다.

실시예 8: 효소반응속도 측정

효소반응 속도에 대한 기질의 농도 영향은 고정된 효소량을 기준으로 하고 표준 파이타제 분석방법을 사용하여 측정(37°C, 0.1M 소듐 아세테이트/아세트산 버퍼 pH 4.5)하였다. 기질의 농도는 0.2mM에서 10mM로 하여 단계별로 측정하였다. 검과는 Sigma Plot 2.01 컴퓨터 프로그램을 사용하여 통계적으로 가장 최적의 직선식(Kuchel과 Ralston, 1988)을 나타내는 한스-울프 플롯(Hansa-Woolf plot) 방법으로 파이타제의 Km과 Vmax를 산출하였다. 실험결과, 재조합 파이타제는 Greiner 등(1993)의 파이타제가 1.5mM의 파이티이트 농도에서 역가가 억제되었다는 보고와는 달리 4mM 이상의 기질농도에서 파이타제 활성이 억제된 것으로 나타났다. 재조합 파이타제의 Kinetic 상수도 Greiner 등(1993)과 달리 나타났는데, Km은 0.63mmol/L, Vmax는 2326μmol/min/mg이었다(도 10).

발명의 효과

이상 실시예와 실험예를 통하여 설명한 바와 같이 본 발명은 파이타제활성이 우수한 PhyE 유전자로 대장균 BL21(DE3)를 형질전환시킨 후 배양하여 재조합 파이타제를 얻는 효과가 있으며 이 재조합 파이타제는 우수한 활성을 나타내고 넓은 pH 범위에서 안정하여 가축사로 첨가제로 사용할 경우 가축성장 촉진 및 가축 분내 인 함량의 저감효과가 있으므로 축산업 및 환경친화산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

대장균 ATCC 33965로부터 분리된 하기 파이타제 유전자(PhyE)의 염기서열.

[illegible]

청구항 2

PhyE 유전자로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)(기탁번호 KFCC 11033).

청구항 3

PhyE 유전자로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)를 배양하여 발현된 재조합 파이타제 효소.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 재조합 파이타제 효소의 활성이 pH 약 2.5 내지 7.5, 온도 4 내지 60°C에서 안정하며 pH는 4.5에서는 최적 파이타제 역가를 나타내고 pH 2.5에서는 최적의 애시드 포스파타제를 나타냄을 특징으로 하는 재조합 파아타제 효소.

첨구함 5

대장균 ATCC 33965로부터 PhyE 유전자를 분리하고

APPA-ATG 5'GCATATGAAAGCGATCTTAACCCAT 3'(NdeI site)

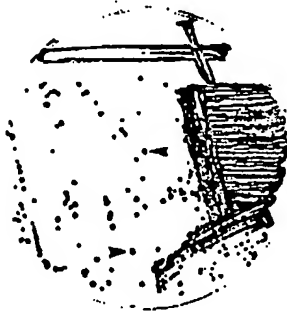
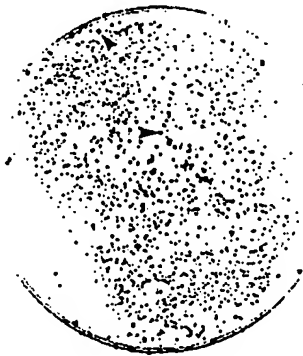
APPA-TAA 5'GGGAATTCATTACAAACTGCACGCCG 3'(EcoRI site)와 함께 PCR로 증폭한 후 엔도뉴클레이즈로 절단하고 NdeI과 EcoRI으로 처리한 pET21a(+) 발현벡터에 라이제이션시키고 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환시킨 후 배양하여 재조합 파이타제 효소를 생산하는 방법.

청구항 6

재조합 파이타제 효소를 음수용 물, 미네랄 블록(mineral block), 알약형, 펠렛형 또는 미생물 형태로 가축용 사료에 공급함을 특징으로 하는 가축사료용 첨가제.

도면

도면1



DPN2

Information for Seq ID NO:1

Sequence characteristics:

- a) Length: 1299 base pairs
b) Type: nucleic acid
c) Strandedness: single
d) Topology: linear

algaagacgcalctaataccatlltllatctctctgallccglltaaccccgcaattgcatttcgctcagagtgagccggagctgaagctggaaa
gtaggggtagtgtagtcgtagcagtgtagtgctgctccaaacaggccacgcaacgtagtcaggagtgtaccccagacgcatggccaaactg
gcccgttaaaactgggtggctgacacccgcccgggtgtagtgatgctgcattccggaacatlaacaaacccgacggatctgttagtagccagc
attgctggcgaaaaggctgaccccgagctctggcagctgcgattatgctatgctgacgagcgtaacgaacaaacgacggagccct
cagcgtlltcggcaactgcgaatccgtagctgcaataaacctgacataccccggcagatagctccagtcgccgtccgttatttaactctlaaaaactg
gctgllgcgaactgcgaataacgggaacgtgtagctgagcgcgaatccagcagggcaggaagggctcaallgtgtagcttlaacggggcatcggcaaa
cggcgcttccgggaactggaaacgggtgcttaatttccgcgaactgcattaaacgggtgcggtagaagcctcgcatcaatgctgacggagatattct
cagggatlltcgaactcggaaactcaagggtgacatcccgcaaatgctcattaaacgggtgcggtagaagcctcgcatcaatgctgacggagatattct
ccgcaaacagcagcaggggaatgccgggacgggggtgggggaaggtacaggcattcacacaggcgggaacaccttgctaagttgctataacg
cgcaatttlltgcataacgcagccagcaggtggttcccgccagcggcgccgcgcaccccggtaltgattgatcaacgacgagctggacggccca
ccccgcanaaacaggcgtatgggtgacattaccactcagtgctgttlltcggcggaacgataactatcgtggcaaatcgtgacggccgac
actgggctcnaactggcgcttcccggtagcgggalaacacccggccaggtggtagaactgggttllgaagcctggcgctggctaaagc
ataaacggcagtgtagtcagggttccgtcttctcagacttaccagcagatgcgtgataaaacccggctgcatlaaatacggccggc
gaggtgaaactgacccctggcagatgtagaagcgaatgcgcagggcagtgcttgcggagggttaccgcaaatgcgaatgtagaagca
cgcatcaccggcgtgcatgttga

도면3

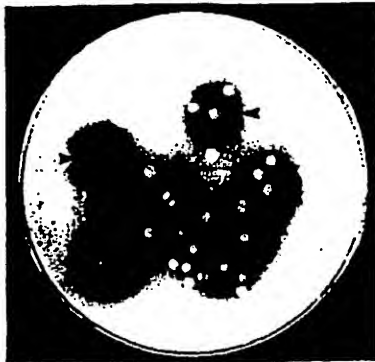
Information for Seq ID NO:2

Sequence characteristics:

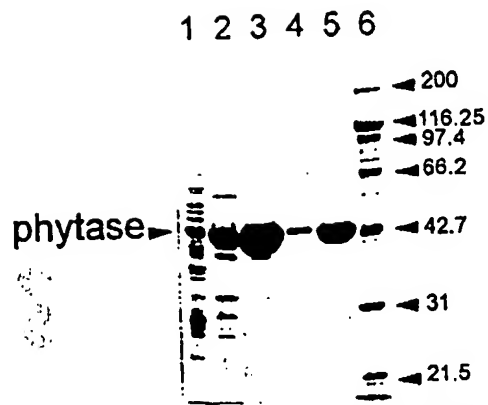
- a) Length: 432 amino acids
- b) Type: protein
- c) Topology: linear

MKAILPFLSLPLTPQSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQ
DVTPTDAWPTWPVKLGWLTPRGGELIAYLGHYQRQLVADGLLAKKGCPQ
SQQVAIADVDERTRKTGEAFAAGLAPDCAITVHTQADTSSPDLPFNPLKTG
VCQDLNANVTAILRAGGSIADFTGHRQTAFRELERVLPFNQSNLCLKREK
QDECSLTLQALPELKVSDANVSLTGAVSLASMLTEIFLLQQAQGMPEPGW
GRITDSHQWNTLLSLHNAQFYLLQRTPEVARSRATPLDLLIKALTPIPPQK
QAYGVTLPTSVLFIAGHDITNLNAGGAELELWNTLPQGPDNTPPGGELVFER
WRRLSDNSQWQIVSLVFQTLQMQMRDKTPLSLNTPPGEVKLTLAGCEERNAQ
GMCSLAGFTQIVNEARIPACSL

도면4

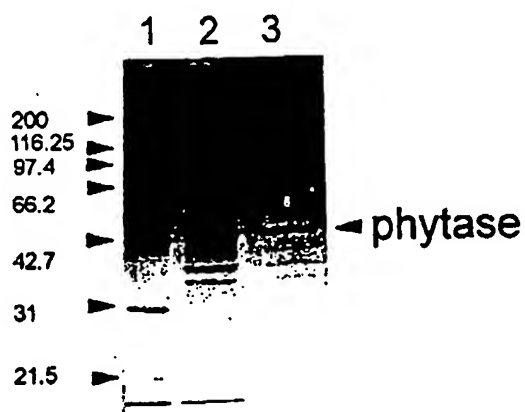


도면5



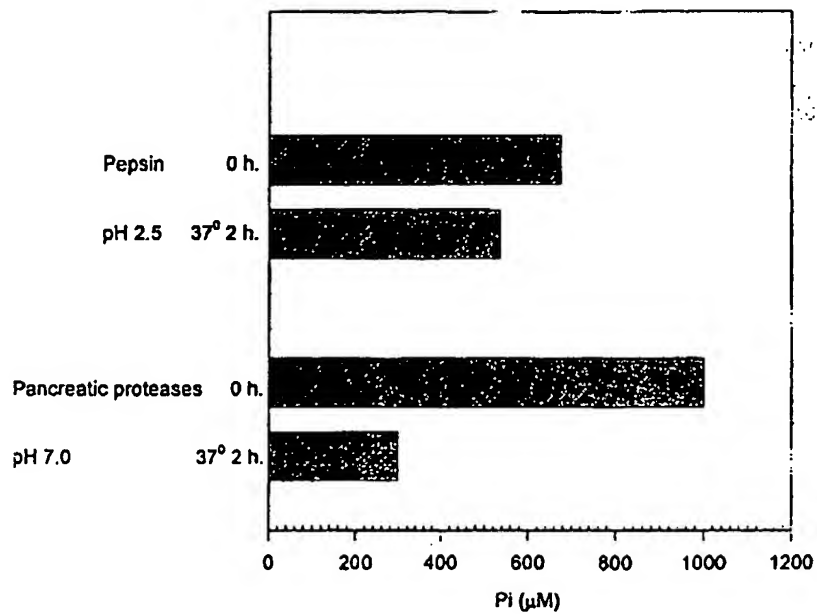
- Lane 1. Total cell extract (cells were disrupted with French press).
 Lane 2. Periplasmic extract (cells were treated with lysozyme at 1 mg/ml).
 Lane 3. After DEAE-Sepharose CL 6B column.
 Lane 4-5. After Sephadex G-75 column.
 Lane 6. Broad range molecular weight standards (Bio-Rad).

도면6

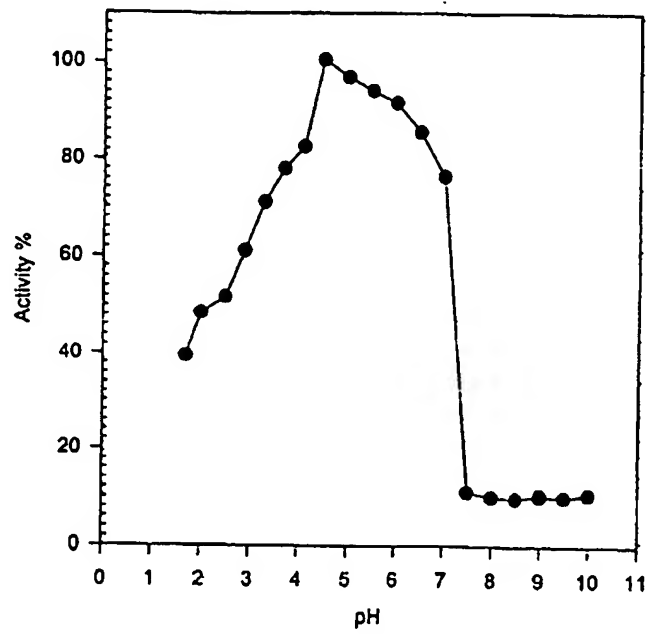


Lane 1. Broad range molecular weight standards (Bio-Rad).
 Lane 2. Total cell extract (cells were disrupted with French press).
 Lane 3. Acid precipitation of total cell extract.

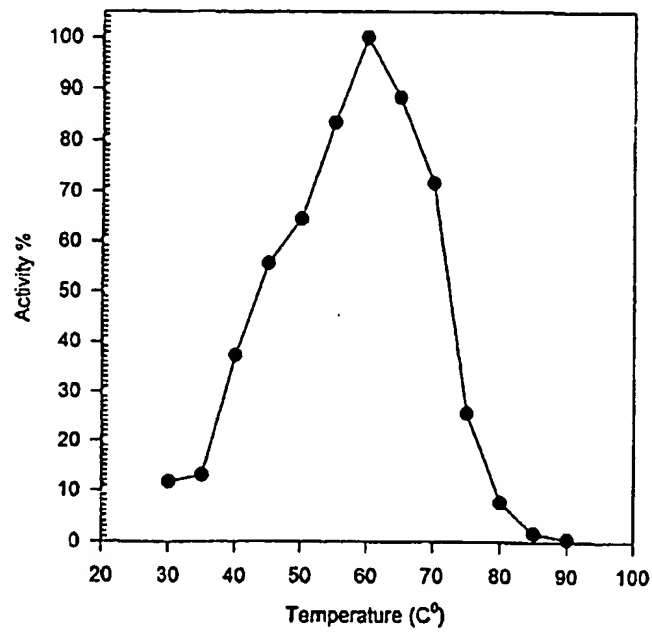
도면7



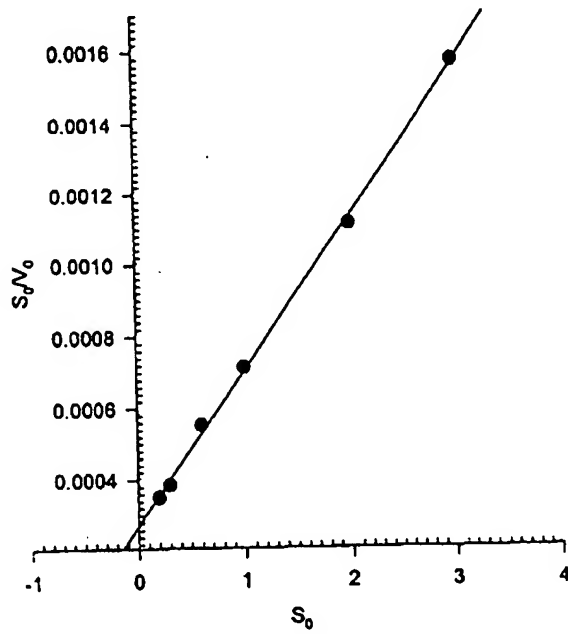
도면8



도면9



도면10



$b[0] \ 2.729 \ e-4$
 $b[1] \ 4.299 \ e-4$
 $r^2 \ 0.99$
 $K_m = 0.63 \text{ mM}$,
 $V_{max} = 2326 \ \mu\text{moles/min/mg}$

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.